Surveillance environnementale des pulvérisations aériennes d'insecticides contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec en 1985

Cahier des méthodologies analytiques pour le *Bacillus thuringiensis*

par

Pierrette Cardinal, microbiologiste

Laboratoire de microbiologie
Gouvernement du Québec
Ministère de l'Énergie et des Ressources
Direction de la Conservation

Service des études environnementales

Gilles Gaboury, biologiste
chef de service

Division de la microbiologie

Jean Cabana, microbiologiste
responsable de division

Québec, janvier 1986

TABLE DES MATIÈRES

Page

REMERCIEMENTS iii

INTRODUCTION 1

REMARQUES GÉNÉRALES 2

MATÉRIEL DE BASE 3

1. Analyse microbiologique du sol (organique et minéral) 4

   1.1 Matériel 4
   1.2 Méthode 4
   1.3 Détermination du pourcentage de poids sec 6
   1.4 Détermination du pH 7
   1.5 Calcul du décompte bactérien 8

2. Analyse microbiologique de l'eau lotique, lentique et potable 9

   2.1 Matériel 9
   2.2 Méthode 9
      2.2.1 Dilution 9
      2.2.2 Filtration 10
   2.3 Détermination du pH 12
   2.4 Calcul du décompte bactérien 12
      2.4.1 Dilution 12
      2.4.2 Filtration 13

3. Analyse microbiologique des membranes filtrantes utilisées dans les moniteurs d'air (extérieur) 14

   3.1 Schéma 14
   3.2 Matériel 14
   3.3 Méthode 15
   3.4 Calcul du décompte bactérien 15

4. Analyse microbiologique des membranes filtrantes des cassettes, air (intérieur) 17

   4.1 Schéma 17
   4.2 Matériel 17
   4.3 Méthode 18
      4.3.1 Analyse de la membrane filtrante 18
      4.3.2 Analyse de la cassette 19
   4.4 Calcul du décompte bactérien 19

TABLE DES MATIÈRES (suite)

Page

5. Analyse microbiologique des membranes de dépôt..... 21

5.1 Matériel..... 21
5.2 Méthode..... 21
5.3 Calcul du décompte bactérien..... 22

6. Bibliographie..... 23

Expression des résultats (Annexe I)..... 24

Chiffres significatifs..... 24
Arrondissement des comptages..... 25

Composition des milieux de culture (Annexe II)..... 26

Méthode de coloration Smirnoff (Annexe III)..... 27

Calcul des limites de détection (Annexe IV)..... 28

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier madame Brigitte Lamontagne et monsieur Jean Cabana pour leur collaboration à la mise au point des techniques d'analyse. Mes remerciements s'adressent également à madame Céline Blanchet pour son appui technique et à messieurs Pierre Martin Marotte, Luc Major, Gilles Gaboury, Renaud Dostie et Guy Parent ainsi que madame Sylvie Delisle pour la révision du texte.

INTRODUCTION

Ce document regroupe l'ensemble des techniques appliquées à l'analyse microbiologique des substrats choisis pour l'étude du comportement des spores viables du Bacillus thuringiensis dans l'environnement, suite aux pulvérisations aériennes. Le sol organique et minéral, l'eau lotique, lentique et potable, l'air et finalement le dépôt au sol feront l'objet de cette étude. Le ministère de l'Énergie et des Ressources a voulu regrouper dans un même cahier toutes les méthodes d'analyses développées ou améliorées depuis deux ans par le laboratoire de microbiologie.

.../2

REMARQUES GÉNÉRALES

- Toutes les manipulations pour l'analyse microbiologique sont faites sous une hotte à flux laminaire.

- Avant d'entreprendre une analyse, le technicien doit prendre soin de se laver les mains au Endbac II^{MD}* ou à l'alcool 70%, ainsi que tout objet qu'il entrera sous la hotte. Afin d'éviter la contamination provenant du milieu environnant, les mouvements de l'intérieur à l'extérieur de la hotte et vice versa seront réduits au minimum. Des contrôles quotidiens de stérilité seront appliqués aux diluants utilisés et à la hotte biologique.

- Les échantillons sont conservés à -20°C.

- Les résultats devront être multipliés par 10 000 puisqu'ils sont tous exprimés en base de 10^4. Ils contiennent trois chiffres significatifs pour les décomptes sur étalement direct et deux chiffres significatifs pour les décomptes sur membrane filtrante (annexe I).

- Considérant qu'une colonie peut provenir d'une seule spore ou d'un amas de spores, les résultats sont exprimés en unité formant des colonies (UFC).

- Tout le matériel entrant en contact avec l'échantillon est stérile.

- La morphologie coloniale du Bacillus thuringiensis est différente selon le milieu de culture utilisé.

---

* Endbac II^{MD}: fabriqué par la compagnie Johnson.

Tableau 1 - Limites de détection

Analyse substrat	Limite de détection
Sol	1000 UFC/gramme
Eau	10 UFC/litre
Air extérieur	3 UFC totales
Air intérieur	4 UFC totales
Dépôt au sol	0,1 UFC/cm^2

- Calculs (annexe IV).

MATÉRIEL DE BASE

- Pipettes stériles (1 ml, 10 ml).
- Alcool 70%, 90%.
- Endbac.
- H_2O distillée stérile.
- pH mètre (Fisher^{MD}).
- Incubateur (Fisher^{MD}), congélateur, réfrigérateur (Foster^{MD}).
- Compteur de colonies (American Optical^{MD}).
- Brûleur.
- Fils à boucle.
- Flacon laveur.
- Microscope, objectif 100 X (Leitz).
- Colorant Smirnoff.
- Plats de Pétri.
- Hotte biologique à flux laminaire (Canadian Cabinet^{MD}).

.../4

1. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DU SOL (ORGANIQUE ET MINÉRAL)

1.1 Matériel

- Erlenmeyers (500 ml).
- Éprouvettes (16 mm).
- Récipients de carton (10 cm X 10cm).
- Récipients de plastique (50 ml).
- Tiges de verre.
- H_2O déminéralisée (pH 7,0).
- H_2O peptonée (0,1%, pH 7,2).
- Milieux de culture PEMBA.
- Agitateur mécanique (Burrell^{MD}).
- Balance (Mettler, $\pm$ 0,01 g).
- Four (Fisher^{MD}).
- Dessiccateur (Fisher^{MD}).
- Mélangeur pour éprouvettes (Canlab^{MD}).

1.2 Méthode

a) Décongeler l'échantillon à température de la pièce.

b) Bien homogénéiser l'échantillon en pressant le sac contenant l'échantillon afin d'éliminer les morceaux de sol compact.

c) Peser 10 g de sol frais dans un erlen de 500 ml contenant 100 ml d'eau peptonée (0,1%, pH 7,2) stérile.

d) Agiter 45 minutes en utilisant un agitateur mécanique.

.../5

e) Prélever trois aliquotes de 0,1 ml de cette suspension et l'étaler sur milieu PEMBA (annexe II) selon la méthode de l'ensemencement par étalement direct.

f) Prélever 0,5 ml de la suspension et l'introduire dans une éprouvette contenant 4,5 ml d'eau peptonée (0,1%, pH 7,2) stérile. Flamber l'encolure et remettre le bouchon. Mélanger au vortex 10 secondes (dilution 10^{-1}).

Procéder ainsi par la suite pour obtenir les dilutions 10^{-2} et 10^{-3}.

g) Lorsque les trois dilutions sont terminées, resuspendre au vortex et prélever trois aliquotes de 0,1 ml de chacune d'elles. Répartir chaque fraction à la surface d'un milieu PEMBA, selon la méthode précédente. Identifier les pétris avec le numéro de l'échantillon et la dilution correspondante.

h) Incuber 24 heures à 37°C (pétris à l'envers pour éviter l'évaporation).

i) Faire le décompte à l'aide d'un compteur de colonies en choisissant les pétris contenant entre 30 et 300 colonies. Ne considérer que les colonies morphologiquement semblables aux colonies de B.t. (vertes, rugueuses, plates) pour le décompte.

j) Prolonger l'incubation de(s) pétri(s) contenant au moins 20 colonies ayant l'apparence du B.t. pour une période totale de 40 heures*.

---

* - Si le pétri est trop contaminé, repiquer 20 colonies semblables au B.t. sur PEMBA. Incuber 40 heures à 37°C.

- Si tous les pétris contiennent moins de 20 colonies, choisir le pétri contenant un nombre de colonies se rapprochant le plus de 20 colonies et compléter en utilisant le(s) pétri(s) contenant le plus grand nombre de colonies.

.../6

k) Prélever 20 colonies sur le pétri le plus représentatif de la population étudiée (pétri comptant près de 20 colonies) et monter des frottis sur lames.

l) Faire une coloration de Smirnoff (annexe III) pour déterminer le pourcentage de B.t. Celui-ci se reconnaît par la présence de cristaux (protéine caractéristique au B.t.) en observant les lames à fort grossissement (1000 x).

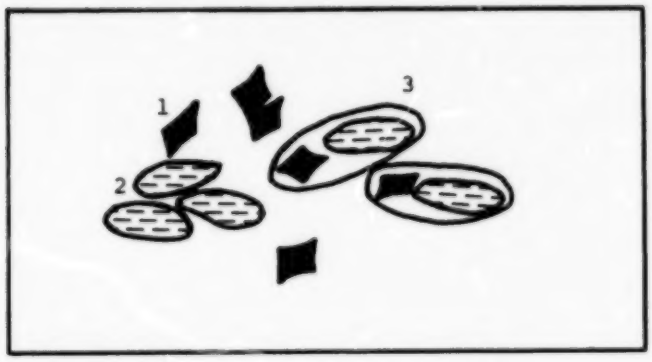

Figure 1 - Cristaux[1], spores[2] et cellules végétatives[3] de Bacillus thuringiensis

1.3 Détermination du pourcentage de poids sec par rapport au sol frais

a) Mettre les récipients de carton dans le four 1 heure, selon la température indiquée en c).

b) Peser 25 g de sol humide dans ces récipients (précision ± 0,01 g).

c) Pour un sol organique, placer au four 24 heures à 70°C, et pour un sol minéral, sécher 24 heures à 105°C.

d) Refroidir dans un dessiccateur, 10 minutes.

e) Peser avec précision le contenant de sol séché.

f) Calculer le pourcentage de poids sec.

Calculs:

$$\% \text{ poids sec} = \frac{\text{Poids sec (sol séché + contenant) - poids du contenant vide séché}}{\text{Poids humide (sol humide + contenant) - poids du contenant vide séché}} \times 100$$

1.4 Détermination du pH

a) Peser 10 g de sol minéral préalablement homogénéisé manuellement. Utiliser 5 g pour les sols organiques.

b) Placer dans des récipients de plastique et ajouter 40 ml d'eau déminéralisée, (pH 7,0).

c) Laisser reposer 30 minutes ou plus en ayant soin d'agiter par intermittence, 5 à 6 fois le mélange sol - eau.

d) Agiter de nouveau avant de plonger l'électrode combinée dans le mélange et noter la lecture obtenue sur le pH mètre après stabilisation (précision ± 0,1).

Remarques: On doit toujours utiliser des solutions tampon calibrées, soit 4,0 et 7,0 afin de vérifier le bon fonctionnement du pH mètre.

Bien rincer l'électrode à l'eau déminéralisée après chaque lecture et éponger avec un papier absorbant propre.

.../8

1.5 Calcul du décompte bactérien

Unité: UFC (unités formant des colonies)
g (gramme de poids sec)

Équation:

$$\frac{[\text{Décompte obtenu ramené à } 10^{*} \text{ (moy.)}] \times [\text{vol. départ (100 ml)}] \times [\% \text{ B.t.}]}{[\text{Volume de l'aliquote (0,1 ml)}] \times [\text{poids utilisé (10 g)}] \times [\% \text{ de poids sec}]}$$

Exemple de calcul:

- Dilution 10^{-1} : 250, 267, 299.
- Dilution 10^{-2} : 35, 31, 30.
- % B.t. : 70%.
- % poids sec : 40%.

Décompte obtenu moy. 10*:

$$\frac{2500 + 2670 + 2990 + 3500 + 3100 + 3000}{6} = 2960 \text{ UFC.}$$

(Il est rare que plus d'une dilution soit considérée).

Donc:

$$\frac{2960 \text{ UFC} \times 100 \text{ ml} \times 70\%}{0{,}1 \text{ ml} \times 10 \text{ g} \times 40\%} = 518\,000 \text{ -- } 51{,}8 \times 10^{4} \text{ UFC/g de poids sec}$$

---

* Limite de détection = 1000 UFC/g.

.../9

2. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE L'EAU LOTIQUE, LENTIQUE ET POTABLE

2.1 Matériel

- Éprouvettes (16 mm).
- H_2O peptonée (0,1%, pH 7,2).
- Milieu de culture PEMBA.
- Filtres (Millipore^{MD}, 0,45 um).
- Entonnoirs (Millipore^{MD}, polypropylène, stériles).
- Pompe à vide (Fisher^{MD}).
- Pinces (Millipore^{MD}).
- Mélangeur pour éprouvettes (Canlab^{MD}).

2.2 Méthode

a) Décongeler l'échantillon à température de la pièce (environ 12 heures).

b) Bien agiter l'échantillon d'eau (30 fois) afin de permettre une homogénéisation complète.

c) Prélever 3 aliquotes de 0,1 ml de l'échantillon et ensemencer sur milieu PEMBA.

d) Selon l'estimation de la quantité de spores contenues dans l'échantillon, celui-ci sera analysé par dilution (forte concentration) et/ou filtration (faible concentration).

2.2.1 Dilution

a) Prélever 0,5 ml de l'échantillon et l'introduire dans une éprouvette contenant 4,5 ml d'eau peptonée (0,1%, pH 7,2) stérile (dilution 10^{-1}). Flamber l'encolure du tube et remettre le bouchon. Mélanger 10 secondes au vortex.

.../10

Procéder ainsi par la suite pour obtenir la dilution 10^{-2}.

b) Lorsque les deux dilutions sont terminées, prélever trois aliquotes de 0,1 ml de chacune d'elles et répartir chaque fraction à la surface d'un milieu PEMBA.

c) Incuber 24 heures à 37°C.

d) Faire le décompte et la détermination du pourcentage de B.t. tel que dans l'analyse du sol.

2.2.2 Filtration

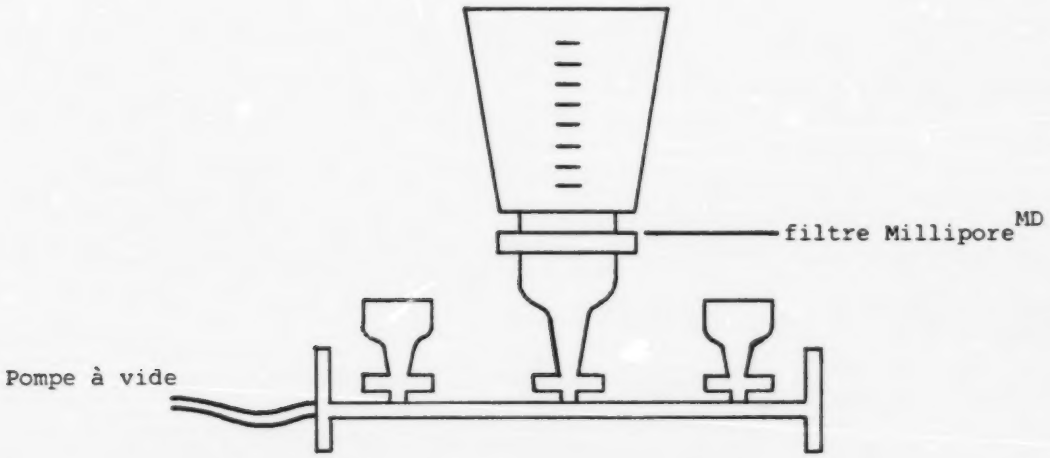

Figure 2 - Montage pour filtration sous vide

a) Assembler une rampe de filtration rattachée à une fiole à vide de 8 litres et s'assurer que le joint est étanche.

b) Placer un entonnoir stérile sur le support.

c) À l'aide de pinces préalablement flambées à l'alcool 90%, saisir une membrane filtrante par son rebord, la retirer de son enveloppe stérile et la déposer au centre du support de l'entonnoir.

d) Mettre en marche la pompe à vide.

e) Faire un témoin pour s'assurer de la stérilité du matériel en filtrant environ 20 ml d'eau distillée stérile contenue dans un flacon laveur.

f) Arrêter la pompe.

g) Débloquer le montage et saisir la membrane filtrante et la transférer sur milieu PEMBA[1].

h) Procéder de même par la suite pour filtrer la quantité désirée (1, 5, 10, 25, 50 ou 100 ml) de l'échantillon[2].

i) Avant de retirer le filtre, rincer au moins 2 fois la paroi interne de l'entonnoir avec 10 ml d'eau distillée stérile contenue dans un flacon laveur après filtration du volume désiré.

j) Lorsque tout l'échantillon a été traité, faire un témoin d'environ 20 ml d'eau distillée stérile réparti sur la paroi de l'entonnoir.

k) Incuber 24 heures à 37° C.

---

1) Il faut déposer la membrane filtrante en la roulant pour obtenir un contact étroit avec la gélose et éviter la formation de bulles d'air entre la membrane et la surface de la gélose.

2) Lorsque le volume analysé est de 10 ml ou moins, il est prélevé à l'aide d'une pipette stérile en suivant les étapes décrites ci-dessous:

   i) Verser de 20 à 25 ml d'eau de dilution stérile dans l'entonnoir de filtration.

   ii) Prélever le volume désiré à l'aide de la pipette stérile.

   iii) Laisser couler l'échantillon en plaçant l'extrémité de la pipette contre l'épaulement interne de l'entonnoir en maintenant la pipette selon un angle de 45° avec l'horizontale.

   iv) Laisser tomber la dernière goutte de l'échantillon en redressant la pipette à la verticale et en touchant la paroi interne de l'entonnoir.

   v) Si la somme des colonies pour tous les volumes filtrés est inférieure à 10, deux volumes de 100 ml sont filtrés.

.../12

1) Faire le décompte en choisissant les pétris contenant entre 20 et 80 colonies et la détermination du pourcentage de B.t. comme précédemment.

2.3 Détermination du pH

a) Remplir un contenant jetable d'environ 40 ml de l'échantillon.

b) Plonger l'électrode combinée dans l'eau et noter la lecture obtenue sur le pH mètre après stabilisation (précision $\pm$ 0,1).

Remarques: On doit toujours utiliser des solutions tampon calibrées, soit 4,0 et 7,0 afin de vérifier le bon fonctionnement du pH mètre.

Bien rincer l'électrode à l'eau déminéralisée après chaque lecture et éponger avec un papier absorbant propre.

2.4 Calcul du décompte bactérien

Unité: UFC (unités formant des colonies) / l (litre)

2.4.1 Dilution

Équation:

$$\frac{[\text{Décompte obtenu ramené à } 10^{*} \text{ (moy.)}] \times [\text{volume total (1000 ml)}] \times [\% \text{ B.t.}]}{[\text{Volume de l'aliquote (0,1 ml)}]}$$

Exemple de calcul:

- Dilution 10^{-1} : 150, 124, 119.
- % B.t. : 70%.

$$\frac{1310 \text{ UFC} \times 1000 \text{ ml} \times 70\%}{0{,}1 \text{ ml}} = 917 \times 10^4 \text{ UFC/litre}$$

.../13

2.4.2 Filtration

Équation:

$$\frac{[\text{Somme des décomptes obtenus}] \times [1000\ \text{ml}] \times [\%\ \text{B.t.}]}{[\text{Somme des volumes filtrés}]}$$

Exemple de calcul:

Volumes de filtration	Décompte
50 ml	75 - 80
25 ml	37 - 29

% B.t. : 70%.

$$\frac{[75 + 80 + 37 + 29\ \text{UFC}] \times 1000\ \text{ml} \times 70\%}{[(2 \times 50\ \text{ml}) + (2 \times 25\ \text{ml})]} = 0{,}10 \times 10^4\ \text{UFC/litre}$$

---

* Limite de détection = 10 UFC/litre.

3. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES MEMBRANES FILTRANTES UTILISÉES DANS LES MONITEURS D'AIR (EXTÉRIEUR)

3.1 Schéma

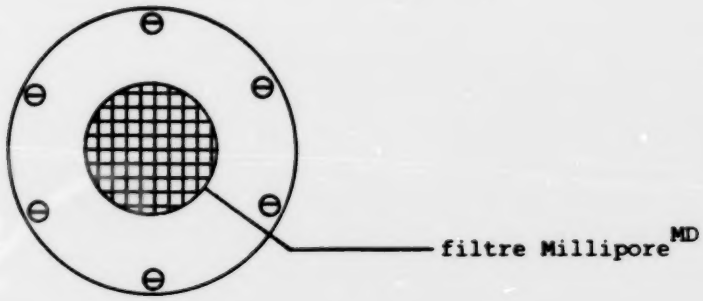

Figure 3 - Moniteur d'air (extérieur)

3.2 Matériel

- Pipettes stériles (1 ml, 10 ml).
- Anti-moussant stérile (Baker Chemical^MD).
- Tween 80, (0,1%, pH 7,2) (Polyoxyéthylène sorbitane monooléate).
- Géloses nutritives.
- Filtres (Millipore^MD, 0,45 um).
- Entonnoirs (Millipore^MD, Polypropylène, stériles).
- Pompe à vide.
- Pinces (Millipore^MD).
- Erlenmeyers (500 ml).
- Agitateur mécanique (Burrell^MD).

.../15

3.3 Méthode

a) Démonter le filtre en prenant soin de ne pas le toucher. Répartir de l'eau distillée stérile à l'aide d'un flacon laveur autour du filtre pour faciliter le décollement. Prélever celui-ci à l'aide de pinces préalablement flambées à l'alcool 90%.

b) Déposer le filtre dans un erlenmeyer (500 ml) contenant 200 ml de Tween 80 (0,1%, pH 7,2) stérile et quelques gouttes d'anti-moussant stérile. Par la suite, agiter la préparation 30 minutes sur l'agitateur mécanique.

c) Prélever le filtre à l'aide de pinces préalablement flambées à l'alcool 90%. Rincer ce dernier avec un volume de 50 ml d'eau distillée stérile à l'aide d'un flacon laveur, tout en maintenant le filtre au-dessus de l'erlen.

d) Déposer le filtre sur gélose nutritive, incuber 24 heures à 37°C.

e) Du volume total, soit 250 ml qui est agité 30 sec. pour permettre une meilleure homogénéisation, filtrer 2 volumes de 50 ml et un volume de 100 ml (voir méthodologie H_2O).

f) Déposer les filtres sur géloses nutritives et incuber 24 heures à 37°C. Faire le décompte et effectuer le pourcentage de B.t. après une période de 50 heures (voir méthodologie H_2O). Ne considérer que les colonies morphologiquement semblables au B.t. (beiges, plates, rugueuses).

g) Garder le 50 ml restant au réfrigérateur en cas de reprises.

3.4 Calcul du décompte bactérien

Unité: UFC totales

$$\frac{[\text{Somme de décomptes obtenus}] \times [250\ \text{ml}] + [\text{Décompte sur filtre}] \times [\%\ \text{B.t.}]\ \text{d'échantillonnage}}{[\text{Somme des volumes filtrés}]}$$

.../16

Exemple de calcul:

Volumes de filtration	Décompte
50 ml	24 - 32
100 ml	55
% B.t.	70%
Décompte sur filtre	21

$$\frac{[24 + 32 + 55 \text{ UFC}] \times [250 \text{ ml}]}{[200 \text{ ml}]} + [21 \text{ UFC}] \times 70\% = 112 \text{ UFC/250 ml}$$

112 UFC/250 ml

* Au nombre total d'UFC obtenus a été ajouté le nombre d'UFC retenus sur le filtre d'échantillonnage après rinçage.

* Limite de détection 3 UFC/250 ml.

4. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES MEMBRANES FILTRANTES DES CASSETTES, AIR (INTÉRIEUR)

4.1 Schéma

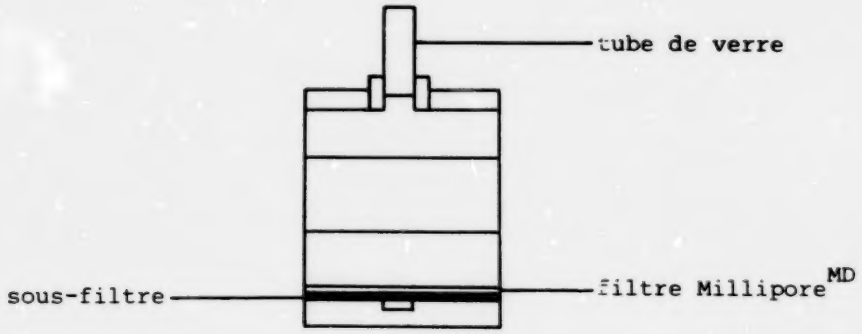

Figure 4: Moniteur d'air (intérieur)

4.2 Matériel

- Anti-moussant stérile (Baker Chemical^{MD}).
- Tween 80 (0,1%, pH 7,2) (Polyoxyéthylène sorbitane monooléate).
- Géloses nutritives.
- Filtres (Millipore^{MD}, 0,45 um).
- Filtres (Nuclépore^{MD}, 0,40 um).
- Entonnoirs (Millipore^{MD}, Polypropylène, stériles).
- Entonnoirs (Millipore^{MD}, Acier inoxydable, stériles).
- Pompe à vide (Fisher^{MD}).
- Erlenmeyers (250 ml, stériles).
- Diméthylsulfoxide (DMSO).
- Gants jetables.

.../18

- Pro-pipette.

- Agitateur mécanique (Burrell^{MD}).

4.3 Méthode

4.3.1 Analyse de la membrane filtrante (Pour cassette ayant un tube de verre*).

a) Enlever le papier d'aluminium recouvrant la cassette.

b) Nettoyer la cassette avec de l'alcool 70%.

c) Ouvrir la cassette et prélever le filtre à l'aide de pinces préalablement flambées à l'alcool 90%. Le sous-filtre est jeté. Déposer le filtre dans 25 ml de DMSO contenu dans un erlenmeyer de 125 ml stérile.

d) Agiter sur agitateur mécanique (réglé à 10) 15 minutes, permettant ainsi la dissolution complète du filtre.

e) De cette solution, filtrer 2 volumes de 10 ml et 1 volume de 5 ml. L'erlen est rincé avec de l'H_2O distillée stérile, à l'aide d'un flacon laveur, et ce volume de rinçage est par la suite filtré (voir analyse de l'eau).

f) Déposer les filtres sur géloses nutritives à l'aide de pinces préalablement flambées à l'alcool 90%. Incuber 24 heures à 37°C.

g) Faire le décompte en choisissant les pétris comptant entre 20 et 80 colonies. Ne considérer que les colonies morphologiquement semblables au B.t. (beiges, plates, rugueuses).

---

* Pour les cassettes n'ayant pas de tube de verre, 3 aliquotes de 0,1 ml sont prélevés et étalés sur gélose nutritive; de plus 2 volumes de 1 ml, 5 ml et 1 volume de 10 ml sont analysés par filtration.

.../19

4.3.2 Analyse de la cassette

a) Rincer la partie supérieure de la cassette avec trois volumes de 50 ml de Tween 80 (0,1%, pH 7,2) stérile, à l'aide d'un flacon laveur. Le rinçage se fait dans les deux sens de la cassette qui est tenue au-dessus d'un erlenmeyer stérile de 250 ml.

b) Du volume total de rinçage (150 ml), 3 aliquotes de 0,1 ml sont prélevés et étalés sur gélose nutritive. De plus, 2 volumes de 1 ml, 10 ml et 1 volume de 100 ml sont analysés par filtration. Incuber 24 heures à 37°C. Faire le décompte en choisissant les pétris comptant entre 20 et 80 ou 30 et 300 colonies selon le cas. Ne considérer que les colonies morphologiquement semblables aux colonies de B.t. (beiges, plates, rugueuses).

c) La solution restante est gardée à 4°C en cas de reprise.

4.4 Calcul du décompte bactérien

Unité: UFC totales

Équation

[Quantité obtenue sur le filtre] + [Quantité obtenue dans la cassette] =

$$\frac{\text{Somme des décomptes obtenus X 25 ml + Décompte obtenu pour rinçage}}{\text{Somme des volumes filtrés}} +$$

$$\frac{\text{Somme des décomptes obtenus X 150 ml}}{\text{Somme des volumes filtrés}} \quad \text{ou} \quad \frac{\text{Moyenne obtenue X 150 ml}}{\text{Volume de l'aliquote (0,1 ml)}}$$

Exemple de calcul:

Pour filtre:

Volumes de filtration	Décompte
10 ml	29 - 33
5 ml	15
Rinçage	34

.../20

Pour cassette:

Volumes de l'aliquote	Décompte
0,1 ml	152 - 171 - 139

$$\frac{29 + 33}{20\ ml} \times 25\ ml + 34 + \frac{154 \times 150}{0,1} =$$

112 + 231 000 = 231 112 UFC totales

= 230 000 = $23,0 \times 10^4$ UFC totales

---

* Max de 300 UFC restent dans la cassette pour des concentrations de l'ordre de 10^4.

* Limite inférieure de détection 4 UFC.

5. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES MEMBRANES DE DÉPÔT

5.1 Matériel

- Géloses nutritives.
- Filtres (Nuclépore^{MD}, 0,4 um).
- Entonnoirs en acier inoxydable (Millipore^{MD}).
- Pompe à vide (Fisher^{MD}).
- Erlenmeyers (250 ml).
- Diméthylsulfoxide (DMSO).
- Gants jetables.
- Pro-pipette.
- Agitateur mécanique (Burrell^{MD}).

5.2 Méthode

a) Nettoyer l'extérieur du pétri contenant les membranes de dépôt avec de l'alcool 70%.

b) Prélever les trois membranes à l'aide de pinces préalablement flambées à l'alcool 90% et les déposer dans un erlen de 250 ml.

c) Rincer les deux parties du pétri avec un volume total de 50 ml de DMSO qui est, par la suite, vidé dans l'erlenmeyer contenant les membranes. Agiter 15 minutes sur agitateur mécanique.

d) Prélever 3 aliquotes de 0,1 ml de la solution ainsi que de la préparation d'une dilution 10^{-1}. Ensemencer sur gélose nutritive. Analyser 2 volumes de 1 ml, 5 ml et 10 ml par filtration avec filtres nuclépore et entonnoirs en acier inoxydable. Déposer les filtres sur gélose nutritive. Incuber 24 heures à 37°C.

e) Couler de la gélose nutritive (55°C) dans le pétri ayant contenu les membranes, afin d'évaluer la quantité de spores restant dans le pétri. Incuber 24 heures à 37°C.

.../22

f) Faire le décompte tel que dans les analyses précédentes.

5.3 Calcul de décompte bactérien

Unité: UFC/cm^2

Équation:

$$\frac{\text{Moyenne des décomptes X 50 ml}}{\text{Volume de l'aliquote}}$$

ou

$$\frac{\text{Somme des décomptes X 50 ml}}{\text{Somme des volumes filtrés}} + [\text{UFC restantes dans le pétri}]$$

$$\text{52 } cm^2 \text{ (surface des trois membranes)}$$

Exemple de calcul:

Volumes filtrés	Décomptes obtenus
10 ml	59 - 68
5 ml	34 - 28

UFC restantes dans le pétri: 122.

$$\frac{\dfrac{59 + 68 + 34 + 28 \text{ UFC X 50 ml}}{30 \text{ ml}} + [122]}{52 \text{ } cm^2} = 8,4 \text{ UFC}/cm^2$$

* Limite inférieure de détection 0,1 UFC/cm^2.

.../23

6. BIBLIOGRAPHIE

1) Arnold E. Greenberg, Standard Methods for the examination of waste water 15e édition, 1980, pp. 806-812.

2) Ch. Collins, Patricia M. Lyne, Microbiological Methods, 5e édition, 1984, pp. 128-132.

3) EPA, Microbiological Manual, Microbiological Methods for monitoring the Environment, pp. 101-107.

4) R. Holbrook, J.M. Anderson, An improved and diagnostic medium for the isolation and enumeration of Bacillus cereus in food , Can. J. Microbiol., vol. 26, 1980, pp. 753-759.

5) S.M. Saleh, R.F. Harris, O.N. Allen, Method for determining Bacillus thuringiensis: var thuringiensis Berliner in soil, Can. J. Microbiol., vol. 15, 1969, pp. 1101-1104.

6) Richard A. Seabo, Twenty-Four Hour Isolation and Confirmation of Bacillus cereus in foods. Journal of food protection, vol. 47, no 11, pp. 856-860. Novembre 1984.

7) Bureau de normalisation du Québec, projet août 1984, pp. 23-25.

8) Smirnoff, W.A. A staining Method for differientiating spores, crystals and cells of Bacillus thuringiensis (Berliner), Journ. of Insect path., vol. 4, no 3, 1962, pp. 384-386.

9) Pierre Audesse, Principes et techniques d'analyses de sol, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, laboratoire du Service de recherche en sol, section chimie et fertilité, 1982.

.../24

ANNEXE I

EXPRESSION DES RÉSULTATS

Chiffres significatifs

Pour prévenir toute fausse précision dans l'expression des dénombrements, ceux-ci doivent être limités au(x) chiffre(s) reconnu(s) sûr(s), plus un autre chiffre qui est incertain. On appelle ces chiffres "Chiffres significatifs".

Par exemple, si un analyste reporte un résultat de 124 à trois chiffres significatifs, il indique qu'il est certain des deux premiers chiffres (1 et 2), mais incertain si le dernier chiffre est 3, 4 ou 5.

Si l'analyste reportait le même nombre 124 à deux chiffres significatifs, il indiquerait alors qu'il est certain du chiffre 1, incertain du chiffre 2 et que le troisième chiffre (4) est inconnu. Il reporterait alors 120 comme résultat.

Les gros comptages comme 1200, 12 000, 120 000 ou 12 000 000 ne renferment toujours que deux chiffres significatifs. Évidemment, les zéros sont significatifs dans les comptages 10, 60, 105, etc.

En ce qui a trait aux méthodes de dénombrement total, (B.H.A.) et la membrane filtrante (M.F.), le nombre de chiffres significatifs rapportés sont ceux dictés par la méthode: à l'intérieur des limites de quantification de chaque méthode, i.e. 20 - 60, 20 - 80, 20 - 100 ou 30 - 300, le nombre actuel de bactéries observées est la meilleure estimation de la vraie densité. Le nombre de chiffres significatifs est égal au nombre de colonies.

Exemple - Nombre de chiffres significatifs (C.S.) reportés:

Comptage	B.H.A.	M.F.
1 - 9	1 C.S.	1 C.S.
10 - 99	2 C.S.	2 C.S.
100 - 300	3 C.S.	----

.../25

Arrondissement des comptages

Puisque les comptages de colonies doivent être limités aux nombres de chiffres significatifs obtenus par la méthode, le nombre autre que zéro qui n'est pas significatif doit être traité selon la convention scientifique normalisée suivante:

Si le nombre non significatif est moins que cinq, le remplacer par zéro.

Exemple: 3530 devient 3500.

Si le nombre non significatif est cinq, arrondir le chiffre précédent au nombre pair le plus près.

Exemple: avec deux chiffres significatifs, 3450 devient 3400 et 3550 devient 3600.

Si le chiffre non significatif est plus grand que cinq, le laisser tomber et augmenter de un le chiffre significatif précédent.

Exemple: 3480 devient 3500.

Jean Trotier, MEQ, 1985

.../26

ANNEXE II

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

Nutrient Agar	Par litre d'eau distillée
- Extrait de boeuf	3,0 g
- Peptone	5,0 g
- Agar	15,0 g

PEMBA (Milieu sélectif pour certains bacilli dont Bacillus cereus et Bacillus thuringiensis)

- Peptone	1,0 g
- Mannitol	10,0 g
- Chlorure de sodium	2,0 g
- Sulfate de magnésium	0,1 g
- Di-Sodium hydrogène phosphate	2,5 g
- Phosphate de potassium di-hydrogène	0,25 g
- Bleu de Bromothymol	0,12 g
- Pyruvate de Sodium	10,0 g
- Agar	14,0 g
- Polymyxine B	100,000 unités
- Émulsion de jaune d'oeuf	50 ml

.../27

ANNEXE III

MÉTHODE DE COLORATION SMIRNOFF

- Préparer un frottis.
- Mettre le réactif A pendant 70 secondes (pendant que la lame est encore chaude).
- Rincer à l'eau.
- Mettre le réactif B pendant 20 secondes.
- Rincer à l'eau et assécher.
- Cristaux: noirs; Spores: lilas clair; Bactéries: lilas.

Pour les cristaux seulement

- Mettre le réactif A pendant 10 minutes.
- Cristaux: noirs.

Coloration de Smirnoff

Réactif A

- 1,5 g d'Amidoschwartz (naphthol blue black C.I 246 Fisher).
- 50 ml de méthanol 98%.
- 40 ml d'eau distillée.
- 10 ml d'acide acétique.

Dissoudre Amidoschwartz dans 50 ml méthanol 98%, 40 ml d'eau et 10 ml d'acide acétique.

Réactif B

- 1 g de Fuchsin Basic (C.I no 677 Fisher) no 42500.
- 10 ml d'éthanol 95%.
- 5 g de phénol.
- 90 ml d'eau distillée.

Dissoudre le Fuchsin Basic dans éthanol.
Dissoudre 5 g phénol dans l'eau distillée.
Mélanger les 2 solutions.
Filtrer et utiliser à 30% en solution aqueuse.

.../28

ANNEXE IV

CALCULS DE LA LIMITE INFÉRIEURE DE DÉTECTION DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES UTILISÉES

1. Sol

1 UFC ----- 0,1 ml de la solution originale
1000 UFC ----- 100 ml de la solution originale (volume final)

1000 UFC ----- 10 g de sol humide ----- 1g de poids sec (minimum)

Limite: 1000 UFC/g de poids sec

2. Eau

1 UFC ----- 100 ml (plus grand volume filtré)
10 UFC ----- 1000 ml (volume total)

Limite: 10 UFC/litre

3. Air extérieur

1 UFC ----- 100 ml (plus grand volume filtré)
2,5 UFC --- 250 ml (volume total)

Limite: 3 UFC totales

4. Air intérieur

Filtre:

1 UFC ----- 10 ml (plus grand volume filtré)
2,5 UFC --- 25 ml (volume total)

Cassette:

1 UFC ----- 100 ml (plus grand volume filtré)
1,5 UFC --- 150 ml (volume total)

Limite: 2,5 + 1,5 = 4 UFC totales

.../29

5. Dépôt au sol

1 UFC ----- 10 ml (plus grand volume filtré)
5 UFC ----- 50 ml (volume total)

5 UFC ----- 52 cm^2
0,096 UFC - 1 cm^2

Limite: 0,1 UFC/cm^2

PC/nf